



a cura di Silvia Cauteruccio e Monica Civera

Dipartimento di Chimica

Università di Milano

silvia.cauteruccio@unimi.it

monica.civera@unimi.it

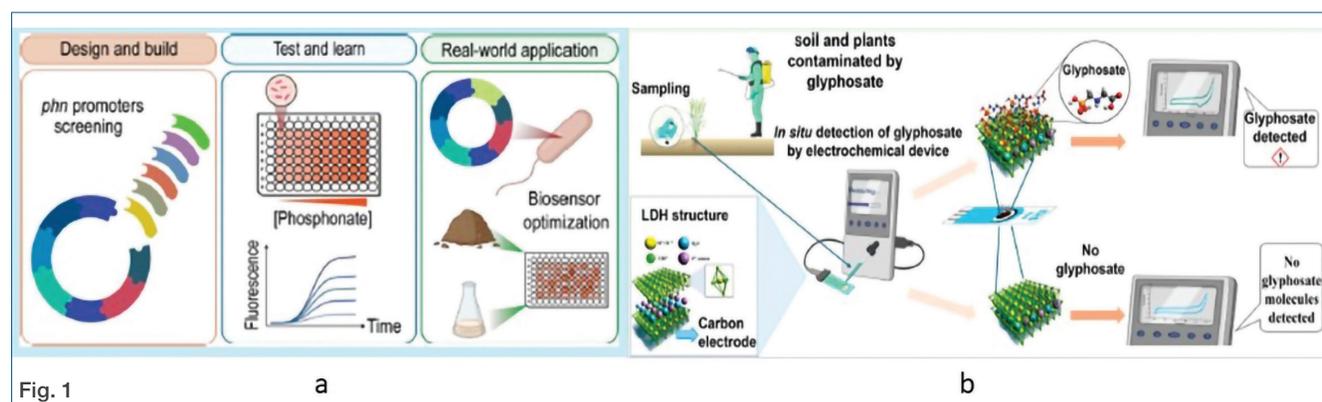
Sensori per la determinazione del glifosato

La *N*-(fosfonometil) glicina, sicuramente più nota come glifosato, è una piccola molecola organica appartenente alla famiglia dei fosfonati sintetici ed è tra i composti più controversi ad oggi utilizzati in ambito agricolo. Il glifosato lo ritroviamo nelle formulazioni di gran parte degli erbicidi impiegati nell'agricoltura intensiva, in quanto permette di ridurre l'impiego di macchine agricole e la lavorazione meccanica in profondità dei terreni adibiti alle coltivazioni per limitare le alterazioni strutturali del suolo. È utilizzato soprattutto per combattere le piante infestanti, in quanto viene assorbito facilmente a livello fogliare e veicolato dal flusso linfatico all'interno della pianta per interferire con i suoi processi vitali senza disperdersi nelle falde acquifere. D'altra parte, tutti questi vantaggi sono stati messi in ombra da numerosi aspetti negativi che si stanno riscontrando nell'uso massiccio di erbicidi a base di glifosato nei confronti di varie forme di vita acquatica, insetti e microrganismi essenziali del suolo con conseguenze dannose anche per il benessere umano.

L'argomento inerente al glifosato è in effetti molto complesso ed in continua evoluzione, soprattutto a livello legislativo, e non sorprende che anche la letteratura proponga continuamente studi riguardanti gli impatti negativi del glifosato sulla salute umana e sull'ambiente, nonché le sfide associate allo sviluppo di tecniche analitiche e strumentali con limiti di rivelabilità sempre più bassi nella determinazione di glifosato in diverse matrici [S. Kumar *et al.*, *Environ. Sci. Adv.*, 2024, **3**, 1030].

A causa della sua elevata solubilità e delle basse quantità solitamente presenti nel suolo e nell'acqua,

la determinazione quali e quantitativa di glifosato in diversi campioni ambientali è un processo tutt'altro che semplice e si avvale principalmente di metodi cromatografici abbinati alla spettrometria di massa, di test immunologici e di biosensori, i quali permettono di raggiungere elevata sensibilità, selettività e rapidità di analisi. Lo sviluppo di biosensori, in particolare, ha mostrato un potenziale enorme nella rilevazione del glifosato, in quanto tecnologie di *bio-sensing* offrono capacità di monitoraggio in tempo reale *in loco* con sensibilità e specificità migliorate, includendo spesso biorecettori o nanomateriali. È stata, ad esempio, riportata per la prima volta una piattaforma di biosensori cellulari basati su fattori di trascrizione in grado di rilevare fosfonati, quali appunto il glifosato [F. Masotti *et al.*, *ACS Synth. Biol.*, 2024, **13**, 3430]. Tali biosensori sono stati messi a punto utilizzando un batterio in grado di degradare il glifosato isolato da terreni contaminati (*Agrobacterium Tumefaciens*, CHLDO) e si confrontano favorevolmente con altre tecniche analitiche, con limiti di rivelabilità compresi tra 0,25 e 50 μM in diversi campioni di suolo e acqua, e possono essere utilizzati anche per altre applicazioni come il rilevamento automatizzato di xenobiotici (Fig. 1a). Valide alternative ai biosensori sono i sensori elettrochimici, nei quali la sensibilità e la selettività dei metodi analitici convenzionali si integrano con la rapidità e la semplicità propria dei metodi elettrochimici. È stato progettato un trasduttore formato da idrossidi doppi stratificati (*Layered Double Hydroxide*, LDH) con Ni e Al aventi difetti superficiali per il rilevamento elettrochimico di glifosato e glufosinato con un limite di rivelabilità fino a 0,081 μM utilizzando la voltammetria a impulsi differenziali [I.





Velázquez-Hernández *et al.*, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2024, **7**, 22617]. Le eccellenti prestazioni di rilevamento del sensore sono state attribuite ai difetti superficiali indotti che hanno consentito modifiche nelle proprietà elettriche superficiali degli idrossidi a doppio strato. A completamento di questo studio è stato inoltre proposto un sensore elettrochimico allo stato solido utilizzando elettrodi di carbonio serigrafati disponibili in commercio e membrane di poli(vinil alcol) per potenziali analisi *in loco* (Fig. 1b).

AlphaFold3 (AF3)

Con questo nuovo tool i ricercatori di DeepMind compiono un ulteriore passo in avanti nel campo della predizione *in silico* di strutture di biomolecole. Dopo il successo e la rivoluzione iniziata con AlphaFold nel 2020, Demis Hassabis e John M. Jumper (vincitori del premio Nobel per la Chimica 2024) hanno applicato la stessa architettura basata sul *deep learning* anche per prevedere con precisione la struttura di complessi contenenti una gamma molto più ampia di biomolecole, tra cui ligandi, ioni, acidi nucleici e residui modificati [J. Abramson *et al.*, *Nature*, 2024, **630**, 493). Inoltre, una delle caratteristiche chiave di AF3 è la sua capacità di prevedere complessi proteina-proteina, compresi quelli che coinvolgono DNA e RNA. Questo rappresenta un grande salto rispetto ad AF2, che si concentrava principalmente sulla previsione delle strutture tridimensionali (3D) delle proteine.

Dal punto di vista dell'architettura le principali modifiche dell'algoritmo riguardano il modulo *evoformer*; infatti, nella nuova versione il sistema riduce il contributo dell'allineamento a sequenza multipla (MSA) sostituendolo con il più semplice modulo *pairformer*. AlphaFold3 elabora l'informazione MSA in modo più semplice per generare una unica *pair representation* del sistema che poi viene passata al modulo che genera la struttura 3D. Questo modulo di predizione della struttura è cambiato rispetto ad AF2, la nuova versione in AF3 utilizza un modulo di diffusione generativa che lavora direttamente sulle coordinate cartesiane degli atomi. L'addestramento della rete avviene aggiungendo del rumore, nella forma di una gaussiana, alle coordinate note in modo che la rete impari a rimuovere

il rumore attraverso un algoritmo di ottimizzazione dell'errore quadratico medio e quindi possa predire le vere coordinate.

Per le interazioni proteina-ligando, gli autori hanno utilizzato il set di benchmark *PoseBusters*, composto da 428 strutture proteina-ligando rilasciate al PDB nel 2021. AF3 supera alcuni classici software di docking nella predizione delle tasche di legame, riuscendo a ottenere risultati accurati anche senza input strutturali, basandosi unicamente sulla sequenza proteica e sulla stringa SMILES del ligando (alcuni esempi sono illustrati in Fig. 2). Anche le modificazioni covalenti (ligandi, siti di glicosilazione) sono accuratamente previste in AF3.

Uno dei principali limiti di AF3 riguarda la gestione della chiralità, poiché il 4% delle strutture generate non sempre la rispetta.

Inoltre, il passaggio ad un tool generativo comporta alcune 'allucinazioni', soprattutto per la predizione di regioni disordinate che vengono erroneamente generate come strutturate. Dal punto di vista conformazionale, le predizioni di AF3 come quelle di AF2, sono limitate dalla 'staticità', ovvero l'impossibilità di cogliere il dinamismo conformazionale. Ad esempio, è noto che le ubiquitina-ligasi E3 adottino una conformazione aperta nella forma apo, ovvero non legata, ed una forma chiusa quando sono legata ai ligandi. Tuttavia, AF3 predice esclusivamente lo stato chiuso della proteina sia per i sistemi legati che per la forma apo.

Rispetto all'articolo pubblicato su *Nature* circa sei mesi fa in cui venivano presentati l'algoritmo e il server per il suo utilizzo, dall'11 novembre gli scienziati hanno la possibilità di scaricare il codice del software e utilizzare AF3 per scopi non commerciali.

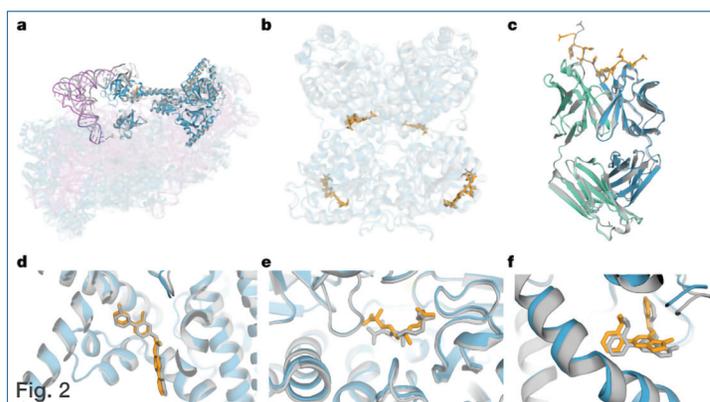


Fig. 2